

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号
特表2002-540760
(P2002-540760A)

(43) 公表日 平成14年12月3日 (2002.12.3)

(51) IntCl ⁷	識別記号	F I	テマコード (参考)
C 1 2 P 19/42		C 1 2 P 19/42	4 B 0 6 4
// (C 1 2 P 19/42		C 1 2 R 1:01	
C 1 2 R 1:01)			

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 22 頁)

(21) 出願番号 特願2000-589722(P2000-589722)
 (86) (22) 出願日 平成11年12月20日 (1999.12.20)
 (85) 翻訳文提出日 平成13年6月14日 (2001.6.14)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP99/10290
 (87) 国際公開番号 WO00/37669
 (87) 国際公開日 平成12年6月29日 (2000.6.29)
 (31) 優先権主張番号 98204325.9
 (32) 優先日 平成10年12月18日 (1998.12.18)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (E P)

(71) 出願人 デーエスエム・ナムローゼ・フェンノート
 シャップ
 DSM NEAMLOZE VENNOO
 TSHAP
 オランダ6411テーエー・ヘールレン、ヘッ
 ト・オーフェルローン1番
 (72) 発明者 ヒューニック ジャン ヘンドリック
 オランダ エヌエル-2651 エクスパー
 ローデンリース ローゼノールド 82
 (74) 代理人 弁理士 中村 稔 (外9名)
 Fターム (参考) 4B064 AF36 CA02 CC01 CC05 CC06
 CC07 CC12 CD12 CD13 DA01

(54) 【発明の名称】 ビタミンB12の改良製造法

(57) 【要約】

本発明はビタミンB12の製造方法に関し、本発明方法は、(a) プロピオニバクテリウム属の株を第一発酵槽で、嫌気性条件下で培養してプロピオニバクテリウムの培養物を得る工程、(b) 工程(a)で得られた培養物の少なくとも一部を第二発酵槽に移送して、この培養物を酸素に暴露する工程、(c) 工程(b)で移送された容量の第一発酵槽部分を新鮮な培養媒体で置換える工程、及び(d) 工程(a)、(b)及び(c)を少なくとも一度繰返す工程、を含む。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ビタミンB12（及び検出可能なビタミンB12活性を有するその前駆体）の非連続製造法であって、

（a）プロピオニバクテリウム属の株を第一発酵槽で、嫌気性条件下で培養してプロピオニバクテリウムの培養物を得る工程、

（b）工程（a）で得られた培養物の少なくとも一部を第二発酵槽に移送して、この培養物を酸素に暴露する工程、

（c）工程（b）で移送された容量の第一発酵槽部分を新鮮な培養媒体で置換える工程、及び

（d）工程（a）、（b）及び（c）を少なくとも一度繰返す工程、を含む事の特徴とする製造法。

【請求項2】 （a）プロピオニバクテリウム属の株を第一発酵槽で、嫌気性条件下で培養する工程、

（b）工程（a）で得られた培養物の容量の少なくとも30～90%、好ましくは少なくとも40～90%、より好ましくは少なくとも50～90%、更に好ましくは少なくとも60～90%、最も好ましくは少なくとも70～90%を第二発酵槽に移送して、この培養物を酸素に暴露する工程、

（c）第一発酵槽において、工程（b）で取出された容量と同じ容量を新鮮な培養媒体で置換える工程、及び

（d）工程（a）、（b）及び（c）を少なくとも一度繰返す工程、を含む、請求項1に記載の製造法。

【請求項3】 生長速度が、嫌気性相中で、0.03～1/時間の範囲で維持される、請求項1又は2に記載の製造法。

【請求項4】 工程（a）における酸素摂取速度が、質量分析及びガスフロー分析で測定して、 $2\text{ mmol O}_2\text{ l}^{-1}\text{ h}^{-1}$ 以下、好ましくは $1\text{ mmol O}_2\text{ l}^{-1}\text{ h}^{-1}$ 以下、最も好ましくはゼロ $\text{ mmol O}_2\text{ l}^{-1}\text{ h}^{-1}$ に近づくものである、請求項1～3の何れか一項に記載の製造法。

【請求項5】 工程（b）における酸素摂取速度が、少なくとも $5\text{ mmol O}_2\text{ l}^{-1}\text{ h}^{-1}$ 、好ましくは少なくとも $20\text{ mmol O}_2\text{ l}^{-1}\text{ h}^{-1}$ 、より好ましくは少なく

とも $40 \text{ mmol O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 、最も好ましくは少なくとも $80 \text{ mmol O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ である、請求項1～4の何れか一項に記載の製造法。

【請求項6】培養媒体が、バタイン、メチオニン及びグルタミンから成る群から選ばれる化合物で補給されて使用される、請求項1～5の何れか一項に記載の製造法。

【請求項7】培養媒体が、1リットル当たり1～40mgの5, 6-ジメチルベンズイミダゾールで更に補給されて使用される、請求項1～6の何れか一項に記載の製造法。

【請求項8】培養媒体のpHを、非解離プロピオン酸の濃度が5mMを超えない様に増加させる、請求項1～7の何れか一項に記載の製造法。

【請求項9】嫌気性条件下の温度が好気性条件下の温度よりも高く、好ましくは、嫌気性条件下の温度は好気性条件下の温度よりも少なくとも2℃、より好ましくは少なくとも4℃、更に好ましくは少なくとも6℃、更に好ましくは少なくとも8℃、更に好ましくは少なくとも10℃、最も好ましくは少なくとも12℃高い、請求項1～8の何れか一項に記載の製造法。

【請求項10】嫌気性条件下の温度が36℃であり、好気性条件下の温度が24℃であり、より好ましくは、それぞれ36℃と30℃である、請求項9に記載の製造法。

【請求項11】株が、フロイデンライチーとシェルマニーの亜種を持つP. フロイデンライチー、P. トエニー、P. ジェンセニー及びP. アシディプロピオニチから成る群から選ばれるプロピオニバクテリウム種の株である、請求項1～10の何れか一項に記載の製造法。

【請求項12】株が、P. フロイデンライチーCBS 929. 97である、請求項11に記載の製造法。

【請求項13】ビタミンB12産生微生物が、P. シェルマニーNOC 11012及び/又はP. フロイデンライチーNOC 11013の様なプロピオニバクテリウム属のプロピオン酸耐性株である、請求項1～12の何れか一項に記載の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、ビタミンB₁₂の製造の為の発酵方法に関する。

(発明の背景)

ビタミンB₁₂は、人間及び動物にとって重要なビタミンである。それは、悪性の貧血及び末梢神経炎の治療に使用され、食事補給として使用される。又、ビタミンB₁₂は、生長増進剤として重要な飼料補給の一つである。

「ビタミンB₁₂」と言う用語は、コバルトコリノイドファミリーの化合物、特にコバラミン群の化合物を述べるのに使用される。この群で最も使用される化合物は、シアノコバラミンであり、「ビタミンB₁₂」と言う用語は、屢、シアノコバラミンを意味して使用される。この明細書においては、「ビタミンB₁₂」の用語は、コバラミン群の全てのコバルトコリノイド、特に、シアノコバラミン、ヒドロキシコバラミン、メチルコバラミン及び、シアノ、ヒドロキシル、メチル又は5'-デスオキシアデノシル基のそれぞれによって特徴付けられる5'-デスオキシアデノシルコバラミンを含める広い意味に理解されるべきである。メチルコバラミンと5'-デスオキシアデノシルコバラミンは、単離形態では光に対して不安定であることが知られていて、水溶液中でヒドロキシコバラミンに簡単に変換される。

【0002】

この理由の為に、殆ど全ての市販のビタミンB₁₂製剤は安定なシアノコバラミンから成り、これは天然に存在するビタミンB₁₂の化学形態ではない。この明細書においては、「天然ビタミンB₁₂」と言う用語は、天然に自然に存在するビタミンB₁₂の化学形態の全てを含み、従って、シアノコバラミンは除かれる様なものと定義される。

ビタミンB₁₂は、殆ど独占的にシュードモナス・デニトリフィカンス(denitrificans)及びプロピオニバクテリウム種を使用する微生物発酵によって工業的に製造される(Spalla et al., 1989 "Microbial production of vitamin B₁₂", in: Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors, E.J. Vandamme

ed., Elsevier, London, New York, pp. 257-284)。シュードモナスとは反対に、プロピオニバクテリアは食品グレードである。従って、プロピオニバクテリウム種を使用する方法は、EP-A-824152で最近開示されている様に、ビタミンB12が産生されるバイオマスと一緒に天然のビタミンB12を形成することの出来る利点を有する。その様な方法は、シアン化とそれに続く有機溶媒を使用する抽出及び精製工程を含む化学的方法による天然ビタミンB12のシアノコバラミンへの転化を回避する。化学的転化工程及びその後の精製工程は、この製造方法を高価で、オペレーターにとって危険なそして環境的に親しみ難いものとしている。

【0003】

プロピオニバクテリアは、様々な工業的方法において価値ある化合物を産生することの出来るグラム陽性バクテリアである。例えば、プロピオニバクテリアは、チーズ、プロピオン酸、香料及びビタミンB12の製造において重要である。

プロピオニバクテリアは、その名の示す通り、プロピオン酸を産生する点に特徴がある。グルコースが炭素源として通常使用されるが、其の他の基質、即ち、フルクトース、マンノース、ガラクトース、グリセロール等が生長の為に使用することが出来る。プロピオン酸に加えて、酢酸が、嫌気性条件下で、プロピオン酸：酢酸が2：1の割合で産生される。プロピオン酸の産生は、この化合物が、其の他多くの微生物、例えば、乳酸バクテリア、酢酸バクテリア及びイーストにとって低い水準の毒性であるので他の種に比べて明らかな利点である。その結果、発酵中に其の他の微生物による汚染の機会が殆ど存在しない。プロピオニバクテリウムに対するプロピオン酸の上限許容水準は、凡そ20～40 g/l (pH 7近辺の発酵で)である。これは、プロピオン酸が生長を抑制することを開始する水準である。非解離プロピオン酸は、プロピオニバクテリウム・シェルマニー(shermanii)に対してNanba et al.(1983, J. Ferment. Technol., 61: 551-556)によって示された如く、プロピオニバクテリアにとって現実の毒性成分である。比生長速度は、5 mM以上の非解離プロピオン酸濃度で急速に減少する。この効果は、又、Blanc et al.(1987, Bioproc. Eng., 2:175-179)によってP. アシディプロピオニチ(acidipropionici)に対して証明され、その生長速度は、4 m

Mプロピオン酸の擬似臨界値以上で劇的に減少する。これは、pH 7近辺での発酵においては、40 g/l以上のプロピオン酸濃度は、極めて低い生長速度で達成されるだけであることを意味する。その様な発酵において産生されるプロピオン酸のこの最大量は、達成できるバイオマスで最大で25~35 g/lとなる。従って、プロピオン酸濃度は、バイオマスの生長にとって一つの制限要因であり、それによってビタミンB₁₂の高収率にとっての制限要因である。

【0004】

幾つかのプロピオニバクテリウム種は大規模発酵法でビタミンB₁₂を産生することが出来る。この方法は、72~88時間の嫌気性発酵と、それに続く72~88時間の好気性相による二段階発酵である。細胞中のビタミンB₁₂濃度は、25~40 mg ビタミンB₁₂/lの一般的な値で好気性相で急速に増加する(例えば、DE 1239694、US 3,411,991、又は、Biochemical engineering and biotechnology handbook, 1991, B. Atkinson ed., Macmillan Publishers Ltd., pp: 1213-1220参照)。嫌気性生長と、それに続く限定生長を伴う好気性相は、プロピオニバクテリウム種を使用するビタミンB₁₂の経済的な産生にとって重要である。然しながら、この要件は、バイオマスの量を上述の通り25~35 g/lに制限する。プロピオン酸毒性の障害を打破してバイオマスを増加させ、それによってビタミンB₁₂の収率を増加させる為に幾つかの試みが為されてきている。

例えば、酸の量を減少させる為に交互の嫌気性-好気性相が提案されている(Ye et al., 1996, J. Ferment. Bioeng. 85: 484-491)。好気性相では、プロピオン酸は毒性の少ない酢酸に転化され、同時にビタミンB₁₂を形成する。ビタミンB₁₂の相対収率は増加したが、最終力価はむしろ低い。これは、恐らく、ビタミンB₁₂の合成の初期における抑制及び/又はビタミンB₁₂の合成を制限する酸素関連生成物によるものである。この方法で産生された最終ビタミンB₁₂は、完全に分離された嫌気性及び好気性相の4.5 mg/lに比べて9 mg/lである。両方の値は、プロピオニバクテリアでのビタミンB₁₂産生にとってはむしろ低いものである。

【0005】

固定化細胞を使用することの提案は、主に、プロピオン酸の産生に焦点が当てられている(Rickert et al., 1998, *Enzyme Microb. Technol.* 22: 409-414)。プロピオン酸産生は、多いに高められる。ビタミンB12産生(Rickert et al. によって言及されていない)の為のこのオプションの使用は、固定化材料でビタミンB12含有細胞を収集することを意味する。これは、固定化装置及び固定化材料それ自身に対する追加コストが現行方法と競合し得る時にのみ可能である。Yongsmith et al.は、プロピオニバクテリウム s p. 株arl AKU1251の固定化細胞でビタミンB12の産生を提案している。最大ビタミンB12濃度は14~16 mg / kg の範囲にあり、先に述べた様な(Yongsmith et al., 1983, *J. Ferment. Technol.* 61: 593-598)自由に懸濁させた細胞での産生の改善にはなっていない。

プロピオニバクテリアは好気性条件下で生長することが出来るが、コリノイド(即ち、ビタミンB12及びその前駆体の一般名)の産生は、0.19 mM = 6 mg O₂ / l の溶解酸素濃度以上では存在しない。酸素濃度が低ければ低い程、コリノイド産生は、非好気化条件下で最大コリノイド産生を伴って益々高くなる(Quesada-Chanto et al., 1998, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49: 732-736)。酸素濃度はビタミンB12合成の制限要因である。

嫌気性相とそれに続く好気性相の繰返し供給-バッチ発酵及び好気性相の最後で培養液の取出しは出来ない。Quesada-Chanto et al.(1998)に依れば、コリノイドの産生は嫌気性条件下が最適であるのに対して、少量の酸素がコリノイドの産生を減少させる。これらの知見は実施例1で得られた結果によって支持される。従って、一つの発酵槽で好気性と嫌気性相を伴う繰返し供給バッチ方法は、経済的に可能性がない。

【0006】

GBP846, 149は、ビタミンB12の合成の為の連続法を開示している。この方法は、プロピオニバクテリウムを、第一ゾーンで嫌気性条件下に、栄養媒体中でこのゾーンに栄養分を添加しながら発酵させ、細胞含有媒体を第一ゾーンから微好気性条件下にある第二ゾーンへ通し、この第二ゾーンからビタミンB12を含有する細胞含有媒体を取出すことを含む。両方のゾーンにおける細胞の

濃度及び媒体の容量は、連続の充填及び取出し操作によって実質的に一定に維持される。この方法は、ビタミンB₁₂の12mg/lまでの合成をもたらすが、もっと古い産生方法に比べて改善されていない。

従って、効率及び／又はビタミンB₁₂の収率を更に改善したビタミンB₁₂の産生の為のプロピオニバクテリウムをベースとした発酵方法に対する必要性が存在する。

【0007】

(発明の開示)

本発明は、ビタミンB₁₂（及び検出可能なビタミンB₁₂活性を有するそれらの前駆体）を製造する為の非連続方法を提供するものであり、本発明方法は、

(a) プロピオニバクテリウム属の株を第一発酵槽で、嫌気性条件下で培養してプロピオニバクテリウムの培養物を得る工程、

(b) 工程(a)で得られた培養物の少なくとも一部を第二発酵槽に移送して、この培養物を酸素に暴露する工程、

(c) 工程(b)で移送された容量の第一発酵槽部分を新鮮な培養媒体で置換える工程、及び

(d) 工程(a)、(b)及び(c)を少なくとも一度繰返す工程、を含む。

【0008】

本明細書において、「ビタミンB₁₂」と言う用語は、コバラミン群の全てのコバルトコリノイド、特に、シアノコバラミン、ヒドロキソコバラミン、メチルコバラミン及び、シアノ、ヒドロキシル、メチル又は5'-デスオキシアデノシル基のそれぞれによって特徴付けられる5'-デスオキシアデノシルコバラミンを含める広い意味に理解されるべきである。「ビタミンB₁₂」と言う用語は、更に、米国薬局方(The National Formulary, 1995, pp. 1719-1721, United States Pharmacopeial Convention Inc., Rockville, MD)に詳細に記述されている、ラクトバチルス・ライヒマニー(*Lactobacillus leichmanii*) ATCC 7830の生長応答に基く比濁生物検定法で検出できるビタミンB₁₂活性を有するビタミンB₁₂前駆体を含む。

本発明方法の一つの観点は、工程（b）で移送され、工程（c）で新鮮な媒体で補給される嫌気性培養物の画分と、一つは、（工程（a）における）嫌気性培養物の生長速度と、今一つは、その後の取出しの間の時間間隔、との間の関係に関する。好ましくは、（工程（b）で移送され、工程（c）で置換えられる）取出し容量は、式：

$$\ln (\text{作業容量} / \text{作業容量} - \text{取出し容量}) = \text{生長速度} * (\text{各取出し間の時間間隔})$$

により、第一発酵槽における培養物の生長速度と各取出し間の時間間隔の関数として、第一発酵槽の全作業容量に関係する。この式において、生長速度は h^{-1} で表示される。一般に、生長速度は、適用される時間間隔にわたって変化させても良く、式においては平均値が適用されても良い。各取出し間の時間間隔は、時間で表示される。好ましくは、嫌気性相中の生長速度は $0.03 \sim 1 \text{ h}^{-1}$ の範囲に維持される。当業者であれば、一定の生長速度においては、時間間隔と取出し容量の両方を減少させることは、本発明の好ましい実施態様ではない連続方法に近づく事になる事が理解されるであろう。

【0009】

本発明方法の一つの実施態様は、

(a) プロピオニバクテリウム属の株を第一発酵槽で、嫌気性条件下で培養する工程、

(b) 工程（a）で得られた培養物の容量の少なくとも30～90%、好ましくは少なくとも40～90%、より好ましくは少なくとも50～90%、更に好ましくは少なくとも60～90%、最も好ましくは少なくとも70～90%を第二発酵槽に移送して、この培養物を酸素に暴露する工程、

(c) 第一発酵槽において、工程（b）で取出された容量と同じ容量を新鮮な培養媒体で置換える工程、及び

(d) 工程（a）、（b）及び（c）を少なくとも一度繰返す工程、を含む。

本発明方法のその他の好ましい実施態様では、嫌気性条件下でプロピオニバクテリウム属の株の培養物（工程（a））は、少なくとも20 g / l の乾燥バイオ

マス、好ましくは30 g/l、好ましくは少なくとも40 g/l、好ましくは少なくとも50 g/l、好ましくは少なくとも60 g/l、好ましくは少なくとも70 g/l、好ましくは少なくとも80 g/l、好ましくは少なくとも90 g/l、最も好ましくは少なくとも100 g/lの乾燥バイオマスをもたらす。

【0010】

使用された微生物の取出し容量と生長速度を知ることによって、当業者は、式から、各取出し間の時間間隔を、従って、全行程の所要時間を簡単に推論することが出来る。

本発明方法のその他の実施態様では、嫌気性相の接種時の溶解酸素濃度は、飽和空気の5%未満、好ましくは2.5%未満、更に好ましくは飽和空気の1%未満である。

好ましくは、本発明方法の嫌気性条件は、嫌気性相(a)中の酸素摂取速度が、質量分析及びガスフロー分析で測定して、 $2 \text{ mmol O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 以下、好ましくは $1 \text{ mmol O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 以下、最も好ましくはゼロ $\text{mmol O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ に近づく様な条件である(例えば、Basic Bioreactor Design, 1991, K. van't Riet & J. Tramper, des., Marcel Dekker Inc.参照)。

本発明方法の工程(b)では、培養物は酸素に暴露される。好ましくは、この方法の好気性相中の酸素摂取速度(OUR)は、少なくとも $5 \text{ mmol O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 、更に好ましくは少なくとも $20 \text{ mmol O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 、なお更に好ましくは少なくとも $40 \text{ mmol O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 、最も好ましくは少なくとも $80 \text{ mmol O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ である。

【0011】

本発明の一つの実施態様によれば、工程(b)の好気性第二相が、少なくとも二つが連続的に結合された好気性発酵槽で行われる方法が提供される。最も好ましくは、工程(b)の好気性第二相は、プラグ流れ形式、例えば、「第二」好気性発酵槽が一連の好気性発酵槽を含む形式で行われる。

プロピオニバクテリアでのビタミンB12の産生の為の適当な培養媒体は、当該技術分野においては公知である(Biochemical engineering and biotechnology handbook, 1991, B. Atkinson ed., Macmillan Publishers Ltd, pp. 1213-12

20参照)。本発明の好ましい実施態様では、培養媒体は、ペタイン、メチオニン及びグルタミンから成る群から選ばれる一種以上の化合物の1~50mMで補給される。この培養媒体に対する其の他の好ましい補給物は、5,6-ジメチルベンズイミダゾール(DBI)である。DBIは、好ましくは、1~40mg DBI/lで補給される。好ましくは、DBIは、好気性相の開始時に、或いはその相中に培養媒体に添加される。

本発明方法の好ましい実施態様では、非解離プロピオン酸の濃度は、それが5mMを超えない様に調節される。これは、当業者に周知の方法によって、培養媒体のpHを増加させることによって行っても良い。

【0012】

本発明のその他の実施態様によれば、嫌気性条件下の温度は、好気性条件下の温度とは異なる。好ましくは、嫌気性条件下の温度は、好気性条件下の温度よりも高い。更に好ましくは、嫌気性条件下の温度は好気性条件下の温度よりも少なくとも2℃高く、更に好ましくは少なくとも4℃高く、更に好ましくは少なくとも10℃高く、最も好ましくは少なくとも12℃高い。例えば、嫌気性条件下の温度は36℃で、好気性条件下の温度は24℃あっても良く、或いは、これらの温度は、それぞれ36℃と30℃であっても良い。

本発明方法では、好ましくは、プロピオニバクテリウム種の株は、Bergey's manual of systematic bacteriology, 1986, J.B. Butler, Williams & Wilkins, p. 1346-1353に記載の古典の、或いは、デアリープロピオニバクテリア(Dairy Propionibacteria)から成る群から選ばれる株が使用される。この群は、就中、フロイデンライチー(freudenreichii)とシェルマニー(shermanii)の亜種を持つP. フロイデンライチー種、P. トエニー(thoenii)種、P. ジェンセニー(jensenii)種及びP. アシディプロピオニチ(acidipropionici)種を含む。更に好ましくはP. フロイデンライチーCBS 929.97の株が使用される。P. フロイデンライチーCBS 929.97は、オランダのCentraal Bureau voor Schimmeltcultures, Baarnに1997年7月10日に寄託された。

【0013】

本発明の一実施態様では、本発明方法は、古典的な突然変異誘発及び/又はD

NA再結合技術によって遺伝的に変性されたプロピオニバクテリアを使用して行われる。古典的に突然変異誘発された株は、プロピオニバクテリウム属、例えば、米国特許第4,544,633号明細書に記載のP. シェルマニーNOC11012及びP. フロイデンライチーNOC11013のプロピオン酸耐性株である事が出来る。プロピオニバクテリウムのプロピオン酸耐性株は、ここでは、同一媒体において、20gプロピオン酸/l及びそうでない場合と比較した時に、ほぼ等しい（即ち、10%未満の差）生長速度を示す株と定義される。

DNA再結合技術によって遺伝的に変性された形質転換されたプロピオニバクテリア株はJ08-056673に例示されている。

本発明方法の利点の一つは、発酵の生産性の増加である。嫌気性相は著しく減少される。 0.06 h^{-1} の生長速度の為には、嫌気性相の産出量は、古典的方法の一発酵槽容量に比べて、72時間で三発酵槽容量である。更に、本発明は、十回の連続充填及び取出しを伴う発酵の往復所要時間を、古典的方法の20%まで減少させる。

本発明方法のその他の利点は、充填及び取出し容量の大きさが比較的大量であっても良いことである。従って、嫌気性下のプロピオン酸の高濃度に起因する生長抑制が起らず、バイオマスの増加をもたらす、それによってビタミンB12の収率の増加をもたらす。本発明方法を使用して形成されるビタミンB12の量は、20~200mg/kgメッシュである。

【0014】

(実施例)

実施例1

小規模の一連の実験で、嫌気性相における少量の酸素は、ビタミンB12の形成をもたらす事が観察された。嫌気性相でのビタミンB12の存在及び「嫌気性相」における少量酸素の存在は、産生されるビタミンB12の全量を著しく減少させた。

作業容量6リットルで、10リットルの二つの実験室規模の攪拌タンク発酵槽を使用した。両方の発酵槽は、プロピオニバクテリウム・フロイデンライチーCBS929.97の急激に生長する細胞を含む1/2段階の種菌の600mlメ

ツシュで接種された。

発酵の6リットル媒体は、次の成分を含有した：120 gのDifco Yeast抽出物、0.6 gのミオイノシトール、264 gのグルコース、30 mgのCoCl₂、0.12 gのパントテン酸カルシウム、12 mlの大豆油。接種後48時間で、5 gグルコース/時間のグルコース供給を開始した。

「参照発酵」は、完全に嫌気性条件下で行ったが、第二発酵では、少量の空気が「嫌気性相」において許された。

結果は表1に示される。

【0015】

【表1】

表1：ビタミンB12の産生での嫌気性相におけるビタミンB12及び/又は酸素の影響

接種後の時間 (h)	ガス組成 (参照発 酵)	ビタミン B 1 2 (mg / l) (参 照発酵)	ガス組成 (+空気)	ビタミン B 1 2 (mg / l) (+空気)
49	ヘッドスペース 450ml N ₂ /分	1	ヘッドスペース 450ml N ₂ /分 + 散布 100ml 空気 /分	2
54	ヘッドスペース 450ml N ₂ /分	1	ヘッドスペース 450ml N ₂ /分 + 散布 100ml 空気 /分	3
72	散布 800ml 空気/分	1	散布 800ml 空気/分	8
96	散布 800ml 空気/分	13	散布 800ml 空気/分	10
120	散布 800ml 空気/分	15	散布 800ml 空気/分	10
144	散布 800ml 空気/分	15	散布 800ml 空気/分	10

【0016】

この実験は、酸素が低い量で存在する条件下で予め生長させたプロピオニバクテリウム細胞中でのビタミン B 1 2 の産生は著しく減少することを確認するものである。従って、嫌気性及び好気性相を交互に繰返し供給するバッチは、有用であるとは考えられない (Ye et al., 1996 参照)。

【0017】

実施例 2

75 リットルの Chemap 発酵槽を使用した。発酵は、プロピオニバクテリウム・フロイデンライチー CBS 929.97 の急激に生長する細胞を含む第二段階の

種菌の5リットルで接種された。

発酵の媒体は次の成分を含有した：15 g/lのExpressa Yeast抽出物、50 g/lのグルコース、5 mg/lのCocI₂。嫌気性生長の72時間後に、発酵槽含有量の50%が除去されて、50%の新鮮媒体で補給された。この手順を96時間、120時間及び144時間で繰返した。取出しは、1、2、3及び4の様に番号を付けた。この嫌気性材料を、5，6-ジメチルベンズイミダゾールと一緒に別の発酵槽中で72時間好気性化した。結果は表2に示される。

【0018】

【表2】

表2：各好気性化取出し物中のビタミンB12濃度の変化

	取出し物1 ビタミンB12 m g/l	取出し物2 ビタミンB12 m g/l	取出し物3 ビタミンB12 m g/l	取出し物4 ビタミンB12 m g/l
取出し直後	0.5	0.8	1	2.5
24時間の好気性 化	14	13	10.7	7.5
48時間の好気性 化	14.2	14.2	10.7	7.5
72時間の好気性 化	15	13.4	10.8	7.5

【0019】

表2は、「充填及び取出し」の原理が機能的であることを示す。然しながら、嫌気性相の最後におけるビタミンB12の濃度は、最適な結果にとっては、好ましくは1 mg ビタミンB12/l以下であるべきである。嫌気性相において既に形成されたビタミンB12は、その後の好気性相における減少されたビタミンB12産生の暗示であり、ビタミンB12の減少された全体収率をもたらす。

【0020】

実施例 3.

実施例 2 と同様に、同じ組成を使用した。嫌気性生長の 72 時間後に、発酵槽含有量の 50 % を除去し、50 % の新鮮媒体で補給した。この手順を様々な時間間隔及び 9 回の取出し容量で繰返した。この取出しを 1 ~ 9 に番号を付けた。この嫌気性材料を、5, 6 - ジメチルベンズイミダゾールと一緒に別の発酵槽中で 72 時間好気性化した。結果は表 3 に示される。

【0021】

【表 3】

表 3 : 取出し容量、時間間隔、好気性化前のビタミン B12 濃度及び最終ビタミン B12 濃度

取出し番号	先の取出しからの 時間 (h)	取出し容量 (%)	好気性化前のビタ ミン B12 (mg/l)	好気性化の最後で のビタミン B12 (mg/l)
1	72	50	0	15
2	24	50	1	17
3	12	50	0.6	16.3
4	16	50	2.8	14.4
5	16	50	3.3	12.2
6	24	75	0.9	10.3
7	24	75	1.1	10.6
8	24	75	0.4	12.8
9	24	75	8.5	10.2

【0022】

この実験は、12 時間毎の 50 % 容量の取出しでの「充填及び取出し」のスケジュールが可能であることを証明している。ビタミン B12 産生は、嫌気性相の最後でのビタミン B12 濃度が 1 mg ビタミン B12 / l である実施例 1 の参照発酵で述べた方法と比肩できるものである。嫌気性相中の酸素濃度を明確に厳密に

制限すること、それによってこの相中のビタミンB₁₂の形成を制限することは、その後の好気性相でのビタミンB₁₂の収率にとって有利である。

【0023】

実施例4

75リットルのChemap発酵槽を使用した。発酵は、プロピオニバクテリウム・フロイデンライチーCBS929.97の急激に生長する細胞を含む第二段階の種菌の5リットルで接種された。

発酵の媒体は次の成分を含有した：15g/lのExpressa Yeast抽出物、50g/lのグルコース、5mg/lのCoCl₂及び痕跡の幾つかの元素。嫌気性生長の72時間後に、発酵槽含有量の40%が除去されて、40%の新鮮媒体で補給された。この手順を12時間間隔で9回繰返した。この取出しを1～9に番号を付けた。この嫌気性材料を、追加の25mg/kgの5,6-ジメチルベンズイミダゾールと一緒に別の発酵槽中で72時間好気性化した。結果は表4に示される。

【0024】

【表4】

表4：12時間毎の取出し容量、好気性化前のビタミンB₁₂濃度及び好気性化された取出し物1、3、5、7及び9で達成された最終ビタミンB₁₂濃度

取出し番号	取出し容量 (%)	好気性化前のビタミン B ₁₂ (mg/l)	好気性化の最後でのビ タミンB ₁₂ (mg/l)
1	40	2	17
3	40	1	18
5	40	1	19
7	40	1	18.5
9	40	1	19

【0025】

この実験は、12時間毎の40%容量の取出しでの「充填及び取出し」のスケ

ジュールが可能であることを証明している。ビタミンB₁₂産生は、全体の実験にわたってその間中一定である。実施例3の50%と比べて、取出し容量の減少は、嫌気性相の最後で達成されるビタミンB₁₂濃度に関して有利である。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 99/10290A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12P19/42

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS WPI EPODOC PAJ NPL XPESP EPO-Internal CA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 668 359 A (BIOTECHNOLOG FORSCHUNG GMBH) 23 August 1995 (1995-08-23) the whole document	1,2,4,6, 7,11
X	GB 846 149 A (DISTILLERS COMPANY LTD) 24 August 1960 (1960-08-24) cited in the application page 1, left-hand column, line 37 right-hand column, line 59	1,2,4,11
A	page 3 -page 5 example 3	1-13
A	EP 0 087 920 A (NIPPON OIL CO LTD) 7 September 1983 (1983-09-07) cited in the application page 5, line 30 - line 37 page 9, line 25 -page 10, line 13 examples 8,9	13

-/-

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 April 2000

Date of mailing of the international search report

19/04/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentplan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Andres, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 99/10290

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 824 152 A (GIST BROCADES BV) 18 February 1998 (1998-02-18) cited in the application abstract; example 4	1-13
A	YE ET AL: "Efficient Production of Vitamin B12 from Propionic Acid Bacteria under Periodic Variation of Dissolved Oxygen Concentration" JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING, vol. 82, no. 5, 1996, pages 484-491, XP002105067 cited in the application see the whole document, particularly Figure 4(a)	1-13
A	QUESADA-CHANTO ET AL: "Effect of the oxygen supply on pattern of growth and corrinoid and organic acid production of Propionibacterium shermanii" APPLIED MICROBIOLOGICAL BIOTECHNOLOGY, vol. 49, 1998, pages 732-735, XP002105068 cited in the application abstract page 735, right-hand column, line 35 - line 41	1-13
A	QUESADA-CHANTO A ET AL: "Effect of oxygen supply on biomass organic acids and vitamin B12 production by Propionibacterium shermanii." WORLD JOURNAL OF MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY NOV., 1998, vol. 14, no. 6, November 1998 (1998-11), pages 843-846, XP000901729 ISSN: 0959-3993	

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 99/10290

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0668359 A	23-08-1995	NONE	
GB 846149 A		NONE	
EP 0087920 A	07-09-1983	JP 1713027 C	27-11-1992
		JP 3078118 B	12-12-1991
		JP 58149694 A	06-09-1983
		JP 1665947 C	29-05-1992
		JP 3028197 B	18-04-1991
		JP 58149695 A	06-09-1983
		JP 1629966 C	20-12-1991
		JP 2049716 B	31-10-1990
		JP 58149696 A	06-09-1983
		US 4544633 A	01-10-1985
		JP 1802653 C	26-11-1993
		JP 3244376 A	31-10-1991
		JP 5006996 B	27-01-1993
EP 0824152 A	18-02-1998	AU 4206597 A	06-03-1998
		BE 1010976 A	02-03-1999
		CA 2261286 A	19-02-1998
		CN 1229440 A	22-09-1999
		WO 9806868 A	19-02-1998
		IT T0970738 A	12-02-1998
		NL 1006764 C	18-11-1997
		NL 1006764 A	10-09-1997
		NO 990653 A	09-04-1999
		PL 331514 A	19-07-1999
		US 5955321 A	21-09-1999

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.